

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Dezember 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/000463 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/00**,
G01N 1/00

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002158

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Juni 2003 (23.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 28 917.4 24. Juni 2002 (24.06.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÜTIG, David
[DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE).

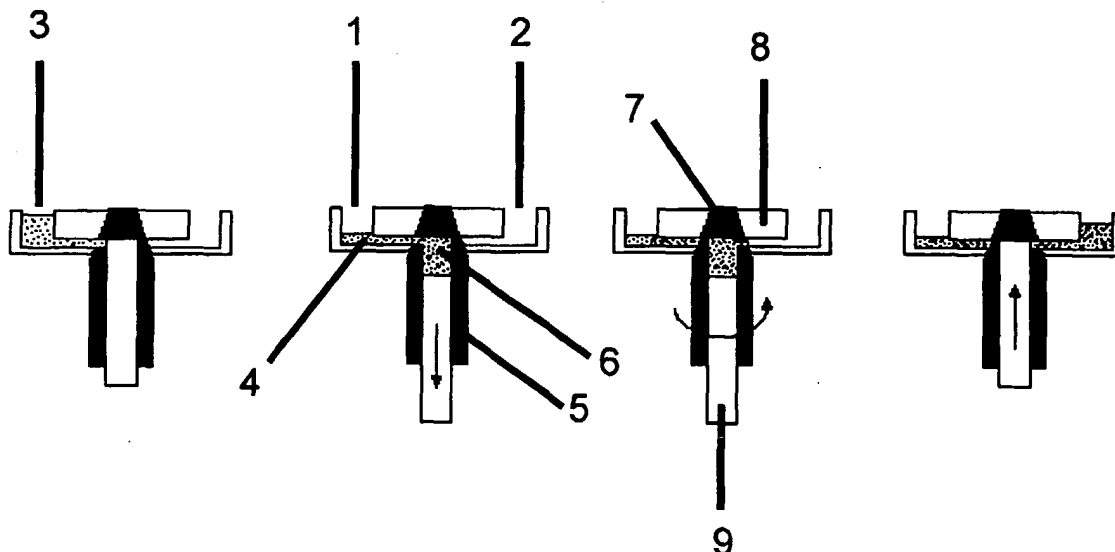
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR HANDLING LIQUIDS CONTAINED IN A PLURALITY OF CHANNELS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR HANDHABUNG VON FLÜSSIGKEITEN IN EINER MEHRZAHL VON KANÄLEN



(57) Abstract: The invention relates to a device for handling liquids contained in at least two channels. Said device consists of one component, referred to subsequently as a channel support, in which the channels extend in a stellate manner from a cone and a second component, subsequently referred to as a pump element, which contains at least one chamber with a variable volume and has a cone-shaped end with at least one integrated lateral opening that is directed towards at least one of the volumes. The cones of the components are fitted into one another in such a way as to permit contact between at least one opening of the pump element and at least one of the channels in the channel support, by rotating the components in relation to one another about the cone axes, the formation of a connection between at least one volume and at least one channel and the closure of other openings and channels by cone surfaces.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2004/000463 A1

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird eine Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten in mindestens zwei Kanälen, bestehend aus einer Komponente, im folgenden Kanalträger genannt, in der die Kanäle sternförmig von einem Kegel ausgehen und einer zweiten Komponente, im folgenden Pumpenelement genannt, welche mindestens eine Kammer mit variablem Volumen beinhaltet und durch ein kegelförmiges Ende mit mindestens einer integrierten seitlichen Öffnung zu mindestens einem der Volumina, wobei die Kegel der Komponenten ineinander eingepasst sind, so dass durch Drehen der Komponenten relativ zueinander um die Kegelachsen mindestens eine Öffnung des Pumpenelementes mit mindestens einem der Kanäle des Kanalträgers in Kontakt gebracht werden kann, und eine Verbindung zwischen mindestens einem Volumen und mindestens einem Kanal zustande kommt, und andere Öffnungen und Kanäle durch Kegelflächen verschlossen werden.

Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten in einer Mehrzahl von Kanälen

5

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Handhabung
von Flüssigkeiten in verschiedenen Kanälen, bestehend aus
10 einem Kanalträger und einem Pumpenelement.

Stand der Technik

Ein Vielzahl von chemischen und molekularbiologischen
15 Prozessen mit Flüssigkeiten wird mit Hilfe von Pipetten
manuell durchgeführt (T. Maniatis et al., Molecular Clo-
ning: A Laboratory Manual, 1989). Zur Einsparung perso-
neller Ressourcen und zur Vermeidung menschlicher Fehler
werden standardisierte Prozesse zur Handhabung von Flüs-
20 sigkeiten in der Regel automatisiert. Ein bekannter Weg
ist die Nachbildung der manuellen Schritte mit einem Ro-
boter, der mit einer Pipettiereinheit ausgestattet ist.
Diese Roboter lohnen sich aber erst bei einem hohen Pro-
bendurchsatz und sind sehr schwierig zu bedienen (L.G.
25 Mendoza et al.; High-throughput microarray-based enzyme-
linked immunosorbent assay; Biotechniques (1999), 4, 778-
788).

Für die Automatisierung von komplexen molekularbiologi-
30 schen Prozessen ist der Transfer von Flüssigkeiten erfor-
derlich. Typische Prozesse dieser Art laufen in Reakti-
onsgefäßen ab, die mit den benötigten Reagenzien befüllt
werden.

35 Ein kritischer Punkt bei dem Transfer von Flüssigkeiten
in komplexen molekularbiologischen Prozessen ist häufig

das Auftreten von Fremdkontamination. Es ist Stand der Technik, dem Problem der Fremdkontamination mit Einwegkomponenten zu begegnen. Bei diagnostischen Anwendungen, bei denen die Kontamination von Proben untereinander abgeschlossen werden muss, geht man sogar so weit, dass ein abgeschlossenes System für jede Probe verlangt wird.

Die Benutzung der Einwegkomponenten ermöglicht in idealer Weise die Entsorgung potentiell kontaminierter Komponenten. Die bekannten Vorrichtungen geschlossener Schlauchsysteme mit Schlauchpumpen und Schlauchquetschventilen führen jedoch zu komplizierten und kostspieligen Apparaturen. Die Schläuche sind bei steigender Komplexität auch umständlich zu wechseln.

Vorrichtungen mit Pumpen zum gerichteten Transport von Flüssigkeiten sind bekannt, und eine große Vielzahl von Kolben- und Membranpumpen sind in vielen Varianten kommerziell erhältlich. Beispiele aus der Patentliteratur sind U.S. 4.741.732 und U.S. 5.034.994 von Crankshaw et al.

Aus DE 10013528 ist eine Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten bekannt, die einen Kanalträger und ein Pumpenelement in Form einer Dosierpumpe aufweist. Nachteilig ist dabei, dass jeder Pumpe nur ein Dosierkanal zugeordnet ist. Damit ist es nicht möglich, in mehrere Kanäle zu dosieren.

Die Dosierpumpe in der Vorrichtung aus DE 10013528 wird von einer Pumpenaufnahmeplatte getragen, was den Aufbau der Dosiervorrichtung verkompliziert. Eine vernünftige Führung der Dichtflächen ist nur durch zusätzliche Komponenten realisierbar.

Manuelle und motorisierte Ventile sind ebenfalls bekannt und werden in einer Vielzahl von technologischen Varianten angeboten. Manuelle und motorisierte Drehventile werden z.B. von Firmen wie Rheodyne, Omnifit und der Argus GmbH, Ettlingen (www.argus-valves.com) angeboten. Weitere bekannte Ventiltechnologien sind zum Beispiel Schlauchquetschventile, Kugelventile und Membranventile.

Vielfach werden auch, wie zum Beispiel von der Firma Cavoro, Kombinationen von Ventilen und Pumpen angeboten, die jedoch für den Einmalgebrauch viel zu teuer sind. Die Kombination eines Drehventils mit einer Kolbenpumpe an einem Ausgang hat auch den weiteren Nachteil, dass der Weg zwischen Ventil und Pumpe ein Totvolumen ist.

Für komplexe Abläufe sind auch integrierte fluidische Systeme vorgeschlagen worden (R.C. Anderson, et al.; A miniature integrated device for automated multistep genetic assays; Nucleic Acids Res. (2000), 12, e60; P.K. Yuen, et al.; Microchip module for blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions; Genome Research (2001), 11, 405-412). Dabei ist es Stand der Technik, die Aktoren für Ventile und Pumpen zu integrieren. Dies verlangt jedoch eine aufwendige und kostspielige Fertigung. Des weiteren haben integrierte Membranpumpen nur kleine Arbeitsvolumina. Ein anderer bekannter Weg ist es zum Beispiel Membranventile zu integrieren, und die Aktoren in eine wiederverwendbare Operationsplattform auszulagern. Dabei ist jedoch pro Ventilfunktion ein externer Aktor nötig. Die beschriebenen Systeme sind also mit einer Vielzahl von Nachteilen behaftet.

Aufgabenstellung

Es ist Aufgabe der Erfindung, eine preiswerte, einfache Vorrichtung zur automatischen Handhabung von Flüssigkei-

ten in einem geschlossenen System bereitzustellen, das aus einer wiederverwendbaren Operationsplattform und Einwegkomponenten besteht. Einwegkomponenten sollen dabei diejenigen Komponenten sein, die mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommen können. Weiterhin sollen die einfachen und robusten Eigenschaften von Drehventilen realisiert werden, wobei der Nachteil des Totvolumens zwischen Drehventil und Pumpe minimiert werden soll. Die Antriebsfunktionen sollen zur Kostenreduzierung mit einer minimalen Anzahl kompakt angeordneter Aktoren durchgeführt werden, die zur leichten Austauschbarkeit der Einwegkomponenten nur von einer Seite an die Einwegkomponenten angreifen sollen.

Die Aufgabe wird gelöst durch eine Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten in mindestens zwei Kanälen mit den im Hauptanspruch gekennzeichneten Merkmalen. Vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist also eine Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten in mindestens zwei Kanälen, bestehend aus einer Komponente, im folgenden Kanalträger genannt, in der die Kanäle sternförmig von einem Kegel ausgehen und einer zweiten Komponente, im folgenden Pumpenelement genannt, welche mindestens eine Kammer mit variablem Volumen beinhaltet und durch ein kegelförmiges Ende mit mindestens einer integrierten seitlichen Öffnung zu mindestens einem der Volumina, wobei die Kegel der Komponenten ineinander eingepasst sind, so dass durch Drehen der Komponenten relativ zueinander um die Kegelachsen mindestens eine Öffnung des Pumpenelementes mit mindestens einem der Kanäle des Kanalträgers in Kontakt gebracht werden kann, und eine Verbindung zwi-

schen mindestens einem Volumen und mindestens einem Kanal zustande kommt, und andere Öffnungen und Kanäle durch Kegelflächen verschlossen werden.

5 Bevorzugt ist, dass ein Kolben darin angeordnet ist, der in Richtung der Kegelachsen bewegbar ist und das Volumen mindestens einer Kammer des Pumpenelements durch einen Kolben variierbar ist.

10 Weiterhin ist bevorzugt, dass darin eine Feder angeordnet ist, die den Kolben bewegt.

Besonders bevorzugt ist ferner, dass darin ein Linearreaktor angeordnet ist, der den Kolben bewegt.

15

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung ist bevorzugt, wobei die Kanäle in dem Kanalträger durch Zusammenfügen von mindestens zwei Flächen gebildet sind, wobei mindestens eine der Flächen mit den offenen Kanälen strukturiert ist, und die Kanäle durch das Zusammenfügen der Flächen gedeckelt werden.

20

Weiterhin ist bevorzugt, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers und dessen Struktur erhältlich ist durch Fräsen, Spritzgießen, Heißprägen, Laserschneiden, Stanzen und/oder Ätzen.

25

Besonders bevorzugt ist es, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers aus Kunststoff, Glas, Metall oder Cellulose Material besteht.

30

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt, die durch mindestens eine weitere Öffnung zugänglich ist.

5

Besonders bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt, in der Reagenzien vorgelegt sind. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass die Reagenzien in fester Form vorliegen.

10

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei man eine automatisierte Bisulfitreaktion durchführt.

15

Beschrieben wird eine Vorrichtung zum Handhaben von Flüssigkeiten in einer Mehrzahl von Kanälen. Diese Vorrichtung besteht aus einem Kanalträger und einem Pumpenelement (Fig. 1), die bevorzugt auf einer Operationsplattform angeordnet werden.

20

Die Kanäle des Kanalträgers sind sternförmig von einem Kegel ausgehend angeordnet. Vorzugsweise kommen die Kanäle in dem Kanalträger durch Zusammenfügen von mindestens zwei Flächen zustande, wobei mindestens eine der Flächen mit den offenen Kanälen strukturiert ist, und die Kanäle durch das Zusammenfügen der Flächen gedeckelt werden.

25

Es ist bevorzugt, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers auf einer Fräse gefertigt wird oder vorzugsweise ein Spritzgussteil ist. Alternativ ist es auch bevorzugt, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers heiß geprägt oder vorzugsweise mit einem Laser strukturiert wird. Alternativ ist es ebenso bevorzugt, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers gestanzt wird oder durch Ätzen strukturiert wird. Mindestens ein Teil des Kanalträgers

30

35

wird aus Kunststoff (z.B. Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat, Polytetrafluorethylen (TEFLON™), Polyvinylchlorid (PVC), Polydimethylsiloxan (PDMS), Polysulfon, Polystyren, Polymethylpenten, Polypropylen, Polyethylen, Polyvinylidin Fluorid oder ABS (Acrylonitril-butadienstyren Copolymer), Glas, Metall oder Cellulose Material gefertigt.

Das Pumpenelement ist gekennzeichnet durch mindestens eine Kammer mit variabelm Volumen und durch ein kegeliges Ende mit mindestens einer integrierten seitlichen Öffnung zu mindestens einem der Volumina, wobei der Kegel des Pumpenelements in den Kegel des Kanalträgers eingepasst wird, so dass durch Drehen der Komponenten relativ zueinander um die Kegelachsen mindestens eine Öffnung des Pumpenelementes mit mindestens einem der Kanäle des Kanalträgers in Kontakt gebracht werden und eine Verbindung zwischen mindestens einem Volumen und mindestens einem Kanal zustande kommt, und alle anderen Öffnungen und Kanäle durch Kegelflächen verschlossen werden.

Bevorzugt ist es, dass die Kammer des Pumpenelements als Zylinder ausgestaltet ist und mit einem beweglichen Kolben das Volumen variiert wird. Besonders bevorzugt ist es, dass der Kolben mit einer Feder in seine Ausgangslage zurückgetrieben wird, wenn er aus dieser herausgebracht wurde.

Bevorzugt hat die Operationsplattform die Funktion, den Kanalträger zu fixieren und das Pumpenelement so gegen den Kanalträger zu pressen, dass die Kegel dieser Komponenten ineinander eingepasst werden. Das Drehen des Pumpenelements um die Kegelachsen wird besonders bevorzugt durch einen in der Operationsplattform angeordneten Motor durchgeführt. Die Bewegung des Kolbens wird bevorzugt

durch einen in der Operationsplattform angeordneten Linearreaktor durchgeführt.

5 Zum Ansaugen einer Flüssigkeit aus einem Kanal des Kanalträgers in eine Kammer des Pumpenelements wird eine Verbindung zwischen dem Kanal und der Kammer hergestellt und das Kammervolumen vergrößert. Die Variation des Kammervolumens erfolgt vorzugsweise durch einen Kolben, der in Richtung der Kegelachsen bewegt wird. Bevorzugt wird der
10 Kolben mit einem Linearreaktor aus der Ausgangslage herausbewegt und besonders bevorzugt mit einer Feder zurückgetrieben.

15 Zur Entnahme einer Flüssigkeit aus einem Strukturelement des Kanalträgers wird eine Kammer des Pumpenelements mit einem Kanal des Kanalträgers verbunden, der mit dem Strukturelement verbunden ist und die Flüssigkeit ansaugt. Es ist bevorzugt, dass Strukturelemente mindestens eine weitere Öffnung enthalten, durch die ein Druckausgleich stattfindet.
20

Zum Ausstoßen einer Flüssigkeit aus einer Kammer des Pumpenelements in einen Kanal des Kanalträgers werden Kanal und Kammer verbunden und das Kammervolumen verkleinert.
25

Zum Befüllen eines Strukturelements des Kanalträgers mit Flüssigkeit aus der Kammer des Pumpenelements wird dieses mit einem Kanal des Kanalträgers verbunden, der mit dem Strukturelement verbunden ist und die Flüssigkeit aus der
30 Kammer des Pumpenelements ausgestoßen. Es ist bevorzugt, dass Strukturelemente mindestens eine weitere Öffnung enthalten, durch die ein Druckausgleich stattfindet.

35 Zum Bewegen einer Flüssigkeit in einem Strukturelement des Kanalträgers wird die Flüssigkeit angesaugt und aus-

gestoßen. Bevorzugt wird die Flüssigkeit zum Bewegen erst ausgestoßen und dann angesaugt.

5 Zum Dosieren wird ein erster Kanal des Kanalträgers in Verbindung mit einer Kammer des Pumpenelements gebracht und die zu dosierende Flüssigkeit in die Kammer angesaugt. Bevorzugt wird nach dem Ansaugen eventuell in der Kammer vorhandene Luft ausgestoßen. Besonders bevorzugt wird dafür die Kammer mit einem dafür vorgesehenen Ent-
10 lüftungskanal des Kanalträgers verbunden. Dann wird die Kammer mit weiteren Kanälen des Kanalträgers verbunden und die Flüssigkeit kontrolliert ausgestoßen.

15 Zum Pumpen einer Flüssigkeit durch ein Strukturelement des Kanalträgers mit mindestens zwei Öffnungen, im folgenden Durchflusselement genannt, wird ein Volumen in das Durchflusselement dosiert, welches das Volumen des Durchflusselements überschreitet. Bevorzugt ist mindestens eine weitere Öffnung des Durchflusselements mit einer Kam-
20 mer verbunden, die im folgenden Auffangkammer genannt wird. Besonders bevorzugt hat die Auffangkammer mindestens eine weitere Öffnung, die durch einen weiteren Kanal mit der Kegelfläche des Kanalträgers verbunden ist und durch welche die das Durchflusselement passierende Flüssigkeit angesaugt wird. Ganz besonders bevorzugt ist es,
25 wenn die Öffnungen zum Flüssigkeitstransport sich am Boden der Auffangkammer befinden, und mindestens eine weitere Öffnung zum Druckausgleich oberhalb des maximal zu erwartenden Füllstands der Auffangkammer vorhanden ist.
30 Weiterhin ist es bevorzugt, die Flüssigkeit in der Auffangkammer vorzulegen und dann durch das Durchflusselement anzusaugen.

35 Zum Mischen von Flüssigkeiten in einer Kammer des Pumpenelements werden die zu mischenden Flüssigkeiten sequenziell oder parallel in die Kammer angesaugt. Bevorzugt

wird das Gemisch dann mindestens einmal ausgestoßen und angesaugt, um so die Durchmischung zu verstärken. Besonders bevorzugt wird die Kammer dazu mit einem dafür vorgesehenem Mischkanal des Kanalträgers verbunden. Ganz besonders bevorzugt ist der Mischkanal mit Strukturelementen versehen, die das Mischen begünstigen.

Zum Mischen von Flüssigkeiten in einer Kammer des Kanalträgers, im folgenden Mischkammer genannt, werden die Flüssigkeiten sequenziell oder parallel in die Mischkammer dosiert. Bevorzugt wird dass Gemisch dann mindestens einmal angesaugt und ausgestoßen, um die Durchmischung zu verstärken. Besonders bevorzugt ist die Mischkammer mit Strukturelementen versehen, die das Mischen begünstigen.

Zum Abtrennen von mindestens einer Komponente aus einer Flüssigkeit wird die Flüssigkeit in ein Strukturelement des Kanalträgers dosiert, im folgenden Absorber genannt, das mindestens eine Oberfläche beinhaltet, welche mindestens eine abzutrennende Komponente bindet. Bevorzugt wird die Flüssigkeit nach dem Abtrennen wieder angesaugt. Besonders bevorzugt ist der Absorber als Durchflusselement ausgebildet.

Zum Aufnehmen einer in dem Absorber abgetrennten Komponente wird eine Flüssigkeit in den Absorber dosiert, welche die gebundene Komponente wieder ablöst (im folgenden Eluent genannt).

Zum Säulen einer Flüssigkeit wird diese in ein Durchflusselement des Kanalträgers dosiert, welches mit einem Säulenmaterial gefüllt ist.

Zum Filtrieren einer Flüssigkeit wird diese in ein Durchflusselement des Kanalträgers dosiert, welches mindestens

einen Filter enthält. Bevorzugt ist das Durchflusselement mit einem Filtermaterial gefüllt.

5 Zum Temperieren einer Flüssigkeit wird diese in eine Kammer des Kanalträgers dosiert, welche im folgenden Temperierkammer genannt wird. Diese wird durch Kontakt mit einem Heiz- oder Kühlelement auf der gewünschten Temperatur gehalten. Bevorzugt ist das Heiz- oder Kühlelement ein Bestandteil des Kanalträgers. Besonders bevorzugt ist das Heiz- oder Kühlelement Bestandteil einer Operationsplattform und in mechanischem Kontakt zu mindestens einer Wandung der Temperierkammer.

15 Die folgende Durchführung einer automatisierten Bisulfitreaktion ist ein Beispiel für eine Anwendung der neuen Vorrichtung:

160 ng DNA werden in einer ersten Kammer des Kanalträgers vorgelegt in 3 µl H₂O bidest. Diese erste Kammer ist nach oben offen und über einen Kanal mit dem Pumpenelement verbunden. 17 µl einer Bisulfitreaktionslösung werden in einer zweiten Kammer vorgelegt. Diese zweite Kammer ist nach oben offen und über einen Kanal mit dem Pumpenelement verbunden. 20 µl Desulfonierungslösung werden in einer dritten Kammer vorgelegt. Diese dritte Kammer ist nach oben offen und über einen Kanal mit dem Pumpenelement verbunden. Ca. 1 ml H₂O bidest. werden in einer vierten Kammer vorgelegt. Diese vierte Kammer ist nach oben offen und über einen Kanal mit dem Pumpenelement verbunden. Eine weitere nach oben offene Kammer, die mit einem Kanal mit dem Pumpenelement verbunden ist, bleibt leer und dient zur Aufnahme von Abfall. Desweiteren ist in dem Kanalträger eine flache Kammer (im folgenden Heizkammer) mit 40 µl Fassungsvermögen vorhanden, die über ein Heizelement in der Operationsplattform temperiert wird und über eine weitere kleine Öffnung zum Druckaus-

gleich verfügt. Ein weiteres Strukturelement mit 200µl Volumen (im folgenden Aufreinigungskammer) ist mit vorgequollenem Säulenmaterial (0,2 g Sephadex G50 mit 190µl H₂O bidest.) gefüllt. Dieses Strukturelement ist über einen weiteren Kanal auf der anderen Seite mit einer weiteren nach oben offenen Kammer verbunden. Des weiteren ist diese offene Kammer mit einem weiteren Kanal mit dem Kegelventil verbunden.

10 In einem ersten Schritt wird die Bisulfitreaktionslösung vollständig mit dem Pumpenelement aufgesaugt und in die Kammer mit der DNA Lösung abgegeben. Das Gemisch wird dann vollständig aufgesaugt und vollständig in die Heizkammer abgegeben. Die Gemisch in der Heizkammer wird für 15 3 Minuten auf 95°C gebracht, dann für 10 min auf 50°C, dann für 30 sec auf 95°C, dann für 30 min auf 50°C, dann wieder für 30 sec auf 95°C und abschließend für 3 h auf 50°C. Während des Inkubationsvorgangs werden 180 µl H₂O aus der vierten Kammer aufgenommen und mit einer Flussrate von 10µl/s in die Aufreinigungskammer abgegeben. Die 20 Flüssigkeit, die sich dann in der Auffangkammer befindet, wird über den direkten Kanal mit dem Pumpenelement aufgenommen und in die Abfallkammer abgegeben. Dann wird das Gemisch wieder aufgenommen und in die Aufreinigungskammer 25 abgegeben, wobei die Flussrate etwa 10 µl/s beträgt. Aus der dritten Kammer werden 180µl H₂O aufgenommen und mit einer Flussrate von etwa 10 µl/s in die Aufreinigungskammer abgegeben. Die Flüssigkeit, die sich in der Auffangkammer hinter der Aufreinigungskammer gesammelt hat, wird 30 über die direkte Kanalverbindung mit dem Pumpenelement aufgenommen und in die Abfallkammer abgegeben. Dann werden weitere 20 µl H₂O aus der dritten Kammer aufgenommen und wieder mit der Flussrate von etwa 10 µl/s in die Aufreinigungskammer abgegeben. Die Flüssigkeit, die sich nun 35 in der Auffangkammer befindet, enthält die aufgereinigte DNA Fraktion. Diese Flüssigkeit wird mit dem Pumpenele-

ment durch den direkten Kanal aufgenommen und in die dritte Kammer mit der Desulfonierungslösung abgegeben. Dann wird 40 µl H₂O aus der vierten Kammer mit dem Pumpenelement aufgenommen und drei Mal in die Heizkammer abgegeben und wieder aufgenommen. Anschließend wird das H₂O in die Abfallkammer abgegeben.

Dann wird das Gemisch aus DNA Lösung und Desulfonierungslösung aus der dritten Kammer aufgenommen und in die Heizkammer abgegeben und für 10 min bei 95 °C gehalten. Abschließend wird das Gemisch mit dem Pumpenelement wieder aufgenommen und in die dritte Kammer abgegeben, wo es zur weiteren Verwendung zur Verfügung steht.

Die optische Analyse einer Flüssigkeit ist ein weiteres Anwendungsbeispiel der neuen Vorrichtung. Dazu wird die Flüssigkeit in eine Kammer des Kanalträgers dosiert. Optisch detektiert werden beispielsweise in der Flüssigkeit: fluoreszierende Komponenten oder FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Paare. Elektronisch detektiert werden beispielsweise in der Flüssigkeit: elektrochemische Potentiale oder angelagerte Komponenten.

Eine weiteres Anwendungsbeispiel ist die Hybridisierung von DNA in einer Flüssigkeit. Dazu wird die Flüssigkeit mit der DNA in eine Kammer des Kanalträgers dosiert, im folgenden Hybridisierungskammer genannt, in der mindestens ein Hybridisierungspartner für die DNA an mindestens einer Oberfläche immobilisiert ist.

Bevorzugt werden die Hybridisierungspartner auf mindestens einer Komponente des Kanalträgers immobilisiert, bevor der Kanalträger vollständig zusammengesetzt wird. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Hybridisierungskammer gleichzeitig um eine Temperierkammer. Ganz besonders bevorzugt wird die DNA vor dem Hybridisieren

und eventuell mindestens einmal während der Hybridisierung denaturiert. Weiterhin ist es bevorzugt, die Flüssigkeit mit der DNA während der Hybridisierung mindestens einmal zu bewegen. Bei den Hybridisierungspartnern handelt es sich um DNA, RNA, PNA, LNA oder Derivate und Modifikationen davon.

Zur optischen Detektion von Hybridisierungsereignissen an immobilisierten Hybridisierungspartnern wird die Hybridisierungskammer gleichzeitig als optische Zelle gestaltet, in der optische Veränderungen aufgrund der Anlagerungen von Komponenten durch die Hybridisierung detektiert werden. Bevorzugt wird bei der optischen Detektion eine räumliche Auflösung erreicht und die Hybridisierung in verschiedenen Regionen erfasst.

Zur elektronischen Detektion von Hybridisierungsereignissen wird mindestens ein Hybridisierungspartner auf mindestens einer Elektrode, im folgenden Detektionselektrode genannt, in der Hybridisierungskammer immobilisiert und mindestens eine elektroaktive Komponente in die Hybridisierungskammer gebracht. Dabei handelt es sich um interkalierende Komponenten, modifizierte DNA, modifizierte DNA Derivate und Komponenten, die Redoxreaktionen mit DNA oder DNA Derivaten eingehen. Je nach Art der elektroaktiven Komponente wird durch Potenzialmessung oder Anlegen geeigneter elektrischer Spannungsmuster und Erfassung der Spannung-Strom-Kurven der Hybridisierungsgrad an den Detektionselektroden ermittelt. Dabei wird mindestens eine weitere Elektrode in der Hybridisierungskammer benutzt.

Ein zusätzliches Beispiel ist die Durchführung einer PCR-Reaktion in der erfindungsgemäßen Vorrichtung:

Zur Durchführung der PCR werden 10ng DNA Templat in 2µl bidest. Wasser mit 2,5µl 10x PCR Puffer (Qiagen), 0,2µl

Taq Polymerase (Qiagen), 0,2 dNTPs (25mM pro Base), 2µl Primermix (jeweils 6,25pmol) und 18,1µl bidest. Wasser gemischt und in die Temperierkammer transferiert. Dann wird die Mischung nach dem folgenden Temperaturprogramm

5 temperiert: 11 Minuten bei 96°C, dann 40mal für 1 Minute bei 55°C, gefolgt von 1 Minute bei 72°C und 1 Minute bei 96°C. Abschließend wird nach einer Minute bei 55°C die Mischung für weitere 20 Minuten bei 72°C gehalten. Bei

10 Zusatz von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie Sybrgreen kann der Fortgang der PCR mit bekannten optischen Anregungs- und Detektionseinheiten direkt beobachtet und ausgewertet werden.

Anstatt eines interkalierenden Farbstoffes sind auch andere Methoden zur Echtzeiterfassung der Polymerase-

15 Kettenreaktion anwendbar, wie zum Beispiel der TaqMan Assay, der Molecular Beacon Assay und der Scorpion Assay.

Legende zu den Figuren:

20 Figur 1: 1: Kanal A; 2: Kanal B; 3: Probenflüssigkeit; 4: seitliche Öffnung; 5: Pumpenelement; 6: Volumen im Pumpenelement; 7: Konus; 8: Kanalträger; 9: Kolben

Figur 2: Ansicht der Operationsplattform

25 1: Temperierblock; 2: Aufnahme für das Pumpenelement; 3: Motor zum Drehen des Pumpenelements; 4: Linearreaktor; 5: Pumpenelement; 6: Kanalträger

Figur 3: Schnitt durch Plattform, Kanalträger und Pumpenelement

30 1: Temperierblock; 2: Aufnahme für das Pumpenelement; 3: Motor zum Drehen des Pumpenelements; 4: Linearreaktor; 5: Stößel vom Linearreaktor; 6: Feder zum Andrücken des Pumpenelements an den Kanalträger; 7: Pumpenelement; 8: Kanalträger; 9: Feder zum Zurücktreiben des Pumpenkolbens;

35 10: Kolben

Figur 4: Aufsicht auf den Kanalträger

1: Temperierkammer; 2: Konus; 3: Säule; 4: Säulenmateri-
al; 5: Fritte; 6: Auffangkammer; 7: Abfall; 8: Desulfo-
nierungslösung; 9: Bisulfitlösung; 10: DNA in Lösung; 11:
H₂O

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Handhabung von Flüssigkeiten in
5 mindestens zwei Kanälen, bestehend aus einer
Komponente, im folgenden Kanalträger genannt, in der
die Kanäle sternförmig von einem Kegel ausgehen und
einer zweiten Komponente, im folgenden Pumpenelement
genannt, welche mindestens eine Kammer mit variablem
10 Volumen beinhaltet und durch ein kegelförmiges Ende
mit mindestens einer integrierten seitlichen Öffnung
zu mindestens einem der Volumina, wobei die Kegel der
Komponenten ineinander eingepasst sind, so dass durch
Drehen der Komponenten relativ zueinander um die Ke-
15 gelachsen mindestens eine Öffnung des Pumpenelementes
mit mindestens einem der Kanäle des Kanalträgers in
Kontakt gebracht werden kann, und eine Verbindung
zwischen mindestens einem Volumen und mindestens ei-
nem Kanal zustande kommt, und andere Öffnungen und
20 Kanäle durch Kegelflächen verschlossen werden.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass ein Kolben darin angeordnet ist, der in Richtung
der Kegelachsen bewegbar ist und das Volumen mindes-
25 tens einer Kammer des Pumpenelements durch einen Kol-
ben variierbar ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
dass darin eine Feder angeordnet ist, die den Kolben
30 bewegt.
4. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
dass darin ein Linearreaktor angeordnet ist, der den
Kolben bewegt.

5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kanäle in dem Kanalträger durch Zusammenfügen von mindestens zwei Flächen gebildet sind, wobei mindestens eine der Flächen mit den offenen Kanälen strukturiert ist, und die Kanäle durch das Zusammenfügen der Flächen gedeckelt sind.
6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers und dessen Struktur erhältlich ist durch Fräsen, Spritzgießen, Heißprägen, Laserschneiden, Stanzen und/oder Ätzen.
7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Teil des Kanalträgers aus Kunststoff, Glas, Metall oder Cellulose Material besteht.
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt.
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt, die durch mindestens eine weitere Öffnung zugänglich ist.
10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Kanal des Kanalträgers zu einer in den Kanalträger strukturierten Kammer führt, in der Reagenzien vorgelegt sind.

11. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
dass die Reagenzien in fester Form vorliegen.
12. Verwendung der Vorrichtung nach einem der vorherge-
henden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man
5 eine automatisierte Bisulfitreaktion durchführt.

Fig. 1

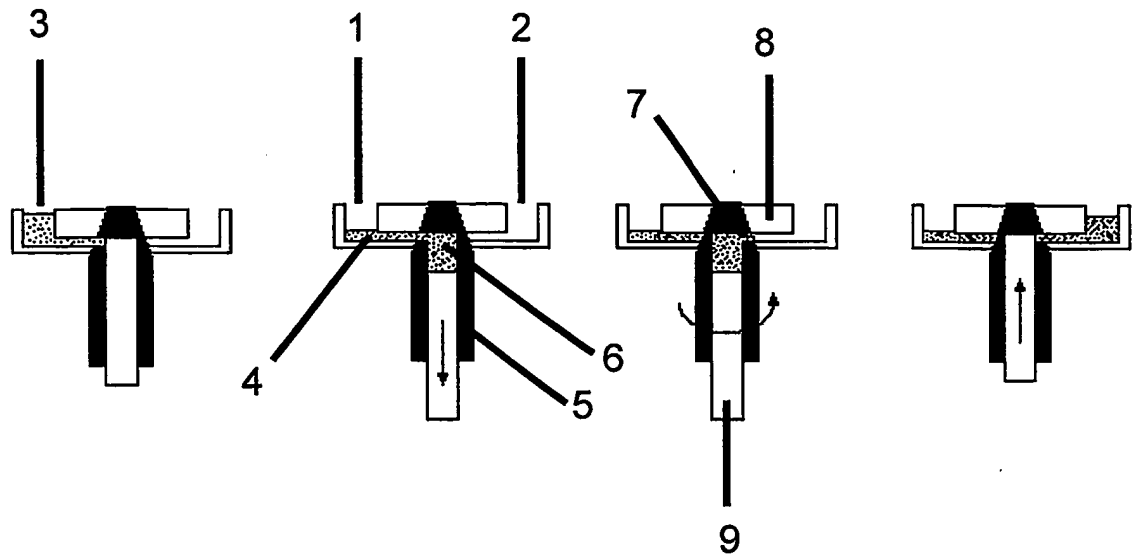


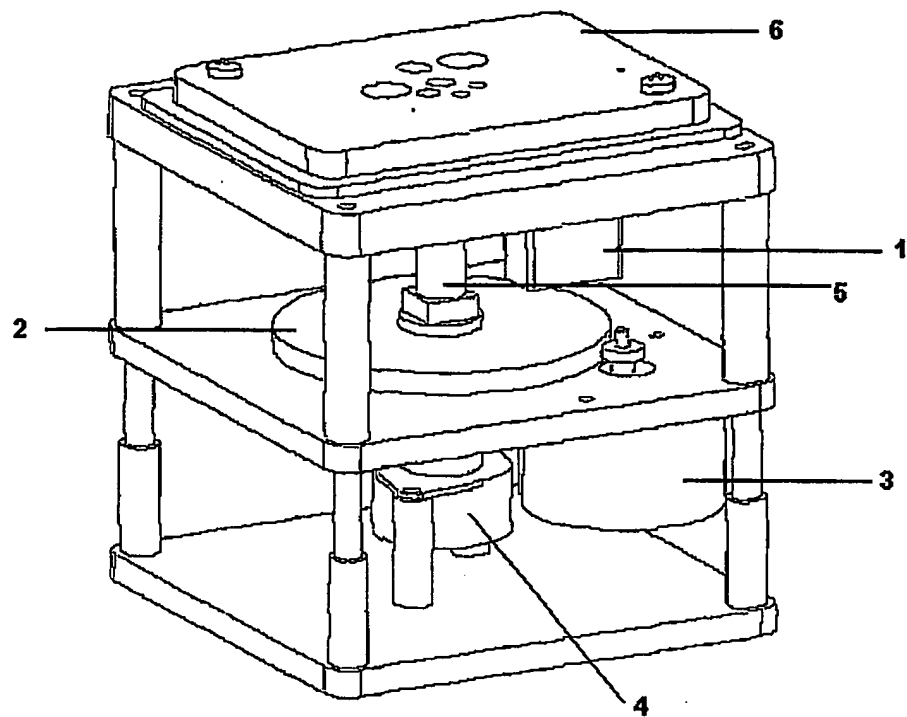
Fig. 2

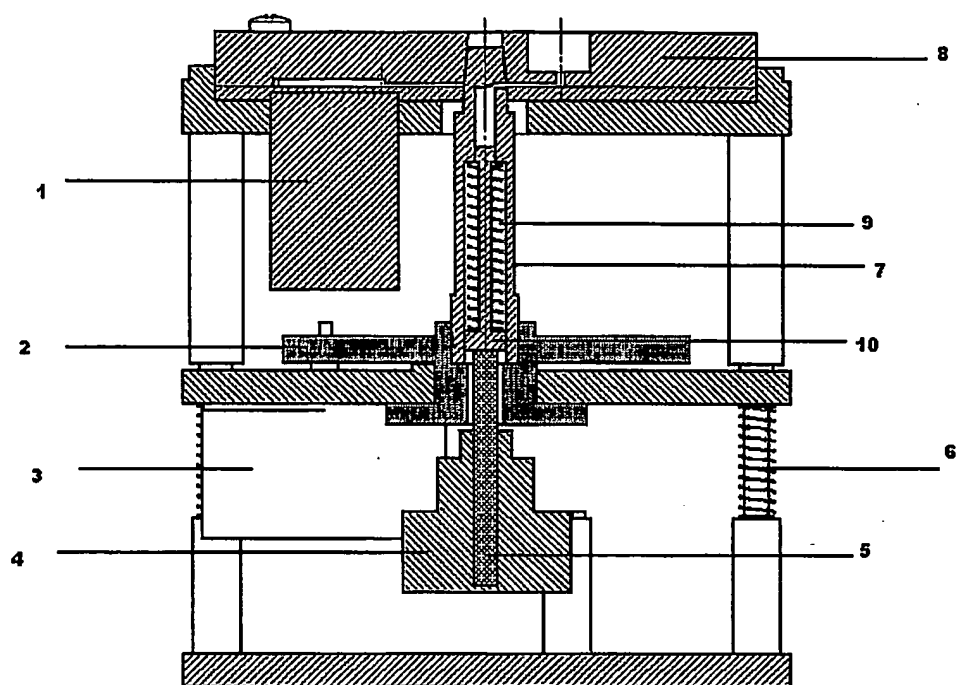
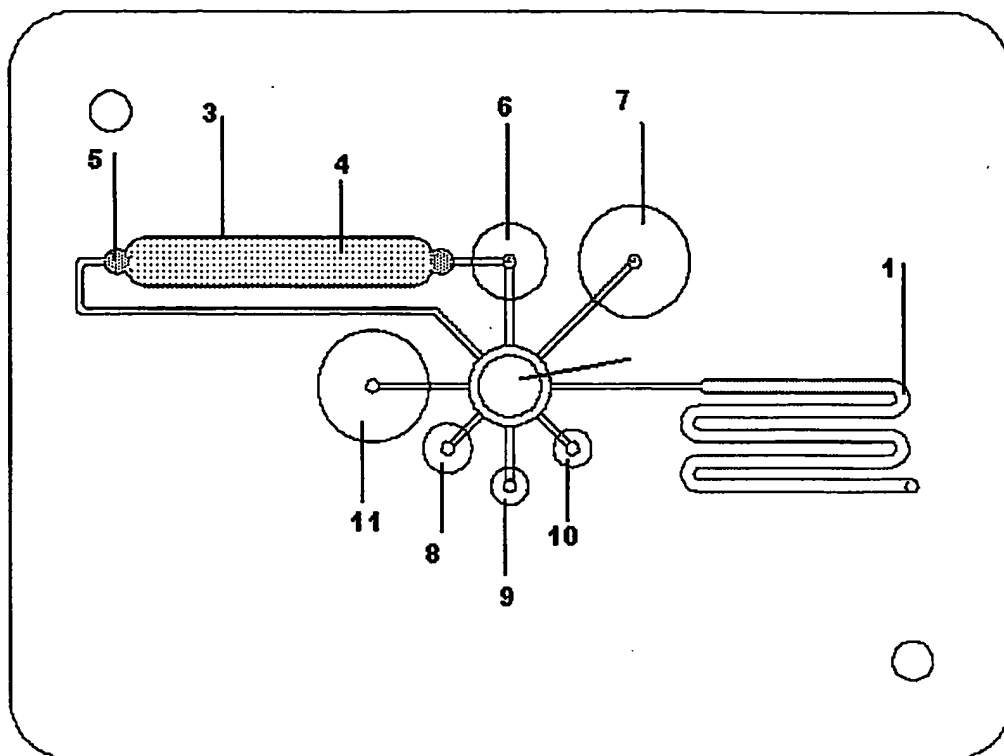
Fig. 3

Fig. 4

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 B01L3/00 G01N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | US 6 374 684 B1 (DORITY DOUGLAS B) 23 April 2002 (2002-04-23) column 7, line 54 -column 10, line 57; figures 10-12 column 1, line 7 -column 1, line 15 column 1, line 46 -column 1, line 61 column 3, line 43 -column 3, line 65 column 5, line 49 -column 5, line 67 --- | 1-12 |
| A | US 6 391 541 B1 (BELGRADER PHILLIP ET AL) 21 May 2002 (2002-05-21) the whole document --- | 1,2,5-11 |
| A | US 5 425 921 A (SHERMAN DAVID ET AL) 20 June 1995 (1995-06-20) the whole document --- -/-- | 1-4,7-12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 2003

Date of mailing of the international search report

02/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tiede, R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | <p data-bbox="289 210 852 315">EP 0 481 285 A (HEWLETT PACKARD CO) 22 April 1992 (1992-04-22) figure 22</p> <p data-bbox="592 315 673 331">-----</p> | 1 |

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6374684 | B1 | 23-04-2002 | AU 7907001 A | 13-03-2002 |
| | | | CA 2419862 A1 | 07-03-2002 |
| | | | EP 1325298 A1 | 09-07-2003 |
| | | | WO 0218902 A1 | 07-03-2002 |
| US 6391541 | B1 | 21-05-2002 | US 2001012612 A1 | 09-08-2001 |
| | | | US 2002019060 A1 | 14-02-2002 |
| | | | AU 5170700 A | 18-12-2000 |
| | | | AU 5300900 A | 18-12-2000 |
| | | | AU 5301000 A | 18-12-2000 |
| | | | CA 2373198 A1 | 07-12-2000 |
| | | | CA 2373249 A1 | 07-12-2000 |
| | | | CA 2374423 A1 | 07-12-2000 |
| | | | EP 1208189 A2 | 29-05-2002 |
| | | | EP 1181098 A1 | 27-02-2002 |
| | | | EP 1180135 A2 | 20-02-2002 |
| | | | JP 2003500674 T | 07-01-2003 |
| | | | JP 2003522521 T | 29-07-2003 |
| | | | JP 2003501018 T | 14-01-2003 |
| | | | WO 0073412 A2 | 07-12-2000 |
| | | | WO 0072970 A1 | 07-12-2000 |
| | | | WO 0073413 A2 | 07-12-2000 |
| US 5425921 | A | 20-06-1995 | AU 5088793 A | 15-03-1994 |
| | | | DE 69314462 D1 | 13-11-1997 |
| | | | DE 69314462 T2 | 20-05-1998 |
| | | | EP 0609431 A1 | 10-08-1994 |
| | | | WO 9404929 A1 | 03-03-1994 |
| EP 0481285 | A | 22-04-1992 | US 5105851 A | 21-04-1992 |
| | | | DE 69129435 D1 | 25-06-1998 |
| | | | DE 69129435 T2 | 07-01-1999 |
| | | | EP 0481285 A2 | 22-04-1992 |
| | | | JP 5118452 A | 14-05-1993 |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01L3/00 G01N1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01L G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>US 6 374 684 B1 (DORITY DOUGLAS B) 23. April 2002 (2002-04-23) Spalte 7, Zeile 54 -Spalte 10, Zeile 57; Abbildungen 10-12 Spalte 1, Zeile 7 -Spalte 1, Zeile 15 Spalte 1, Zeile 46 -Spalte 1, Zeile 61 Spalte 3, Zeile 43 -Spalte 3, Zeile 65 Spalte 5, Zeile 49 -Spalte 5, Zeile 67</p> <p>----</p> | 1-12 |
| A | <p>US 6 391 541 B1 (BELGRADER PHILLIP ET AL) 21. Mai 2002 (2002-05-21) das ganze Dokument</p> <p>----</p> | 1,2,5-11 |
| A | <p>US 5 425 921 A (SHERMAN DAVID ET AL) 20. Juni 1995 (1995-06-20) das ganze Dokument</p> <p>----</p> | 1-4,7-12 |
| | -/-- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- * T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- * X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- * Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- * &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tiede, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | EP 0 481 285 A (HEWLETT PACKARD CO) 22. April 1992 (1992-04-22) Abbildung 22 ----- | 1 |

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|--|----|-------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------------------------|
| US 6374684 | B1 | 23-04-2002 | AU | 7907001 A | 13-03-2002 |
| | | | CA | 2419862 A1 | 07-03-2002 |
| | | | EP | 1325298 A1 | 09-07-2003 |
| | | | WO | 0218902 A1 | 07-03-2002 |
| US 6391541 | B1 | 21-05-2002 | US | 2001012612 A1 | 09-08-2001 |
| | | | US | 2002019060 A1 | 14-02-2002 |
| | | | AU | 5170700 A | 18-12-2000 |
| | | | AU | 5300900 A | 18-12-2000 |
| | | | AU | 5301000 A | 18-12-2000 |
| | | | CA | 2373198 A1 | 07-12-2000 |
| | | | CA | 2373249 A1 | 07-12-2000 |
| | | | CA | 2374423 A1 | 07-12-2000 |
| | | | EP | 1208189 A2 | 29-05-2002 |
| | | | EP | 1181098 A1 | 27-02-2002 |
| | | | EP | 1180135 A2 | 20-02-2002 |
| | | | JP | 2003500674 T | 07-01-2003 |
| | | | JP | 2003522521 T | 29-07-2003 |
| | | | JP | 2003501018 T | 14-01-2003 |
| | | | WO | 0073412 A2 | 07-12-2000 |
| | | | WO | 0072970 A1 | 07-12-2000 |
| | | | WO | 0073413 A2 | 07-12-2000 |
| US 5425921 | A | 20-06-1995 | AU | 5088793 A | 15-03-1994 |
| | | | DE | 69314462 D1 | 13-11-1997 |
| | | | DE | 69314462 T2 | 20-05-1998 |
| | | | EP | 0609431 A1 | 10-08-1994 |
| | | | WO | 9404929 A1 | 03-03-1994 |
| EP 0481285 | A | 22-04-1992 | US | 5105851 A | 21-04-1992 |
| | | | DE | 69129435 D1 | 25-06-1998 |
| | | | DE | 69129435 T2 | 07-01-1999 |
| | | | EP | 0481285 A2 | 22-04-1992 |
| | | | JP | 5118452 A | 14-05-1993 |